

Analisis Kimiawi Fraksi n-Heksana dari Tanaman Purwoceng (*Pimpinella Alpina* Molk)

Zahroul Umami Qodri^a, Bambang Cahyono^{a*}, Meiny Suzery^a

^a Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang

* Corresponding author: cahyono@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: Pimpinella alpina, antioxidants, coumarin</p>	<p>Quantification of total phenolate content, total flavonoids, antioxidant activity test (DPPH), and chromatographic identification of phenolic compounds of the coumarin class in the p-nan hexane fraction of <i>Pimpinella alpina</i> Molk have been performed. The results showed that the total phenolic compound content of n-hexane fraction was 45.04 mg equivalent of galic acid/gram of dry fraction. While the total flavonoid content of the n-hexane fraction was 5.58 mg equivalent of quercetin/gram of dry fraction. Antioxidant activity with DPPH method obtained IC₅₀ is 13485 ppm. The identification of the coumarin class of column chromatography yielded 11 fractions, based on the KLT profile results after being sprayed with NH₃ color reagent and viewed under a 365 nm UV lamp. It has been found that the positive F 1 fraction contains a class of coumarin compounds exhibited by yellow-green stains. However, the chemical structure of the compound can not yet be proposed.</p>
<p>Kata kunci: Pimpinella alpina, antioksidan, kumarin</p>	<p>Abstrak</p> <p>Telah dilakukan kuantifikasi kandungan fenolat total, flavonoid total, uji aktivitas antioksidan (DPPH), serta identifikasi secara kromatografi senyawa fenolat dari golongan kumarin dalam fraksi n-heksana <i>Pimpinella alpina</i> Molk. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan senyawa fenolat total fraksi n-heksana, yaitu 45,04 mg ekuivalen asam galat/gram fraksi kering. Sedangkan kandungan flavonoid total fraksi n-heksana yaitu 5,58 mg ekuivalen kuersetin/gram fraksi kering. Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH diperoleh IC₅₀ yaitu 13485 ppm. Identifikasi dari golongan kumarin dari kromatografi kolom dihasilkan 11 fraksi, berdasarkan hasil profil KLT setelah disemprot dengan pereaksi warna NH₃ dan dilihat di bawah lampu UV 365 nm, ditunjukkan bahwa fraksi F₁ positif mengandung golongan senyawa kumarin yang ditunjukkan oleh noda berwarna hijau kuning. Bagaimanapun struktur kimia dari senyawa tersebut hingga saat ini belum dapat diusulkan.</p>

1. Pendahuluan

Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk) merupakan salah satu tanaman obat Indonesia yang hanya dapat ditemukan secara endemik di dataran tinggi Dieng, Wonosobo, Jawa Tengah. Secara taksonomi, tanaman ini termasuk famili *Apiaceae* dari genus *Pimpinella*, beberapa spesies lain adalah *P. anisum*, *P. Saxifraga*, *P. thellungiana*, *P. villosa*, dan lain-lain. Tumbuhan dari famili *Apiaceae* ini memiliki aktivitas biologis sebagai

antimalaria, antimikroba, antijamur, dan antioksidan [1, 2].

Tumbuhan genus *Pimpinella* diketahui mengandung metabolit sekunder seperti minyak atsiri, fenolat, stigmaterol, flavonoid, saponin, dan senyawa aromatik lainnya yang berfungsi sebagai afrodisiak, antijamur, antibakteri, antikanker, dan antiinflamasi [3, 4]. Analisis praklinis terhadap tanaman ini dilakukan untuk senyawa-senyawa yang larut dalam etanol.

Eksplorasi terhadap fraksi non polar, seperti n-heksana, terhadap tanaman Purwoceng hingga saat ini belum pernah dilakukan. Hal ini penting dilaksanakan mengingat dalam fraksi n-heksana diduga mengandung pula senyawa-senyawa biotif yang memiliki sifat farmakologis yang menarik. Pada penelitian ini akan difokuskan pada analisis fenolat total, flavonoid total dan aktivitas antioksidan terhadap fraksi n-heksana, serta usaha memperoleh informasi terhadap salah satu komponen aktif yang terkandung didalamnya melalui pemurnian kromatografi. Senyawa kumarin ditemukan hampir di setiap bagian tumbuh-tumbuhan mulai dari akar, batang, daun sampai bunga dan juga buah [5]. Jenis senyawa kumarin dalam *Pimpinella alpina* Molk belum diketahui dan belum banyak dilakukan penelitian. Tertarik akan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk melakukan isolasi dan identifikasi kandungan senyawa kumarin pada *Pimpinella alpina* Molk. Hal ini perlu dilakukan sebagai upaya untuk pengembangan formulasi obat tradisional di Indonesia.

2. Metodologi

Alat & Bahan

Peralatan yang digunakan yaitu seperangkat alat soklet, tabung reaksi, gelas ukur, labu takar, pipet tetes, pipet gondok, pipa kapiler, pipet mikro, gelas beaker, plat tetes, erlenmeyer, corong kaca, corong pisah, kolom kromatografi, botol vial, botol semprot, chamber KLT, neraca analitik (Kern-870), statif dan klem, kertas saring, kompor listrik, vakum rotary evaporator (Buchi-B480), lampu detektor UV (Spectroline ENF-24/F), dan spektrofotometer UV-Vis (Optizen UV2120).

Bahan yang digunakan adalah sampel penelitian berupa tanaman *Pimpinella alpina* Molk kering, H₂SO₄ p.a. (merck), HCl p.a. (merck), serbuk Mg p.a., amil alkohol p.a., FeCl₃ p.a. (merck), anhidrida asam asetat p.a (merck), NH₃, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendroff, akuades, etanol 96%, eter p.a., toluena p.a., asam asetat 10 %, kloroform p.a., etil asetat p.a., aseton p.a., diklorometana p.a., metanol p.a., dan n-heksana p.a., asam galat (merck), kuersetin (merck), reagen Folin-Ciocalteu, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil p.a. (merck), larutan AlCl₃, larutan potasium asetat, larutan Na₂CO₃, NaOH, plat silika gel 60 GF₂₅₄ (merck), silika gel 60 G (merck) untuk kromatografi kolom, plat KLT dengan silika gel 60 (tanpa indikator fluoresen) ukuran 5x20 cm dengan ketebalan silika sebesar 0,25 mm untuk preparatif.

Penyiapan Sampel

Sampel *Pimpinella alpina* Molk kering diperoleh dari kelompok tani Desa Sikunang, Dieng, Wonosobo, Jawa Tengah. Sampel kemudian dibersihkan dan dihaluskan untuk mendapat serbuk *Pimpinella alpina* Molk.

Pembuatan Ekstrak *Pimpinella alpina* Molk

Serbuk *Pimpinella alpina* Molk dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam soklet yang telah dilengkapi dengan kondensor serta pelarut etanol 96% ke dalam labu alas bulat, proses sokletasi dilakukan

selama ± 8 jam. Hasil sokletasi kemudian diuapkan pelarutnya (etanol 96%) dengan rotary vacuum evaporator hingga sepertiga volume untuk mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak ini kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksana di dalam corong pisah, selanjutnya dilakukan analisis senyawa fenolat total, senyawa flavonoid total, uji aktivitas antioksidan, dan isolasi senyawa kumarin melalui pemurnian kromatografi dalam fraksi n-heksana.

Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat

Larutan asam galat (dalam akuades) dibuat dengan konsentrasi 30, 40, 50, 60 dan 70 ppm. Dari masing-masing konsentrasi tersebut, dipipet 0,05 mL ditambahkan 0,4 mL akuades dan 2 mL reagen Folin-Ciocalteu lalu dikocok sampai homogen dan terbentuk larutan berwarna kuning jernih. Larutan didiamkan selama 8 menit, kemudian ditambahkan 1,6 mL larutan Na₂CO₃ 7,5%, lalu dikocok hingga homogen. Larutan kembali didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar hingga terbentuk warna biru. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm [6], lalu dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (mg/L) dengan absorbansi.

Penentuan Kandungan Fenolat Total

Larutan fraksi n-heksana dibuat dengan konsentrasi 2000 ppm dalam akuades. Sebanyak 0,05 mL dari larutan ekstrak ditambahkan dengan 0,4 mL akuades dan 2 mL reagen Folin-Ciocalteu, dikocok sampai homogen dan terbentuk larutan berwarna jernih kekuningan. Larutan didiamkan selama 8 menit, selanjutnya ditambahkan 1,6 mL larutan Na₂CO₃ 7,5% lalu dikocok sampai homogen. Larutan kembali didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar hingga terbentuk warna biru. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm [6]. Kadar fenol yang diperoleh merupakan mg ekuivalen asam galat/gram sampel kering.

Pembuatan Kurva Kalibrasi Kuersetin

Larutan kuersetin (dalam metanol) dibuat dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Dari masing-masing konsentrasi dipipet 0,5 mL dan dicampurkan dengan 1,5 mL metanol dan 0,1 mL AlCl₃ 10%. Setelah didiamkan selama 6 menit, larutan ditambahkan dengan 0,1 mL potasium asetat 1M dan didiamkan kembali selama 6 menit. Kemudian larutan diencerkan hingga 5 mL. Larutan digojog kemudian didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 415 nm [7].

Penentuan Kandungan Flavonoid Total

Kandungan senyawa flavonoid total ditentukan berdasarkan metode kerja Soltani dkk. [7], [8]. Larutan fraksi n-heksana (dalam metanol) dibuat dengan konsentrasi 5000 ppm. Dari larutan fraksi tersebut dipipet 0,5 mL dan dicampurkan dengan 1,5 mL metanol dan 0,1 mL AlCl₃ 10%. Setelah didiamkan selama 6 menit, larutan ditambahkan dengan 0,1 mL potasium

asetat 1M dan didiamkan kembali selama 6 menit. Kemudian larutan diencerkan hingga 5 mL. Larutan digojog kemudian didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 415 nm. Kadar flavonoid yang diperoleh merupakan mg ekuivalen kuersetin/gram sampel kering.

Uji Aktivitas Antioksidan

Fraksi n-heksana dalam metanol dibuat konsentrasi 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 12000, dan 14000 ppm. Untuk menentukan aktivitas antioksidan, masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan 3 mL larutan DPPH 0,1 mM. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap hingga warna ungu larutan berkurang atau terbentuk larutan warna merah muda atau kekuningan. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm [9]. Kemampuan untuk meredam radikal DPPH (inhibisi) dihitung menggunakan persamaan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Selanjutnya dilakukan perhitungan IC_{50} yang merupakan konsentrasi sampel untuk dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH. Nilai IC_{50} diperoleh dari perpotongan garis antara 50% daya inhibisi dengan konsentrasi sampel.

Uji pendahuluan Kumarin

Prosedur deteksi kumarin dalam tanaman dengan metode Farnsworth [10] yaitu dengan memasukkan 1 mL sampel dalam tabung reaksi, tutup tabung reaksi dengan kertas saring yang dibasahi dengan larutan NaOH. Kemudian tempatkan di dalam penangas air mendidih selama beberapa menit, kertas di angkat dan dilihat di bawah lampu UV 365 nm. Uji positif kumarin ditandai dengan terbentuknya fluorosensi hijau-kuning yang muncul dalam beberapa menit.

Prosedur uji kumarin menggunakan KLT [11, 12], yaitu dengan menotolkan fraksi n-heksana ke adsorben pada plat KLT, kemudian plat KLT dimasukkan ke dalam chamber KLT yang berisi fase gerak n-heksana:diklorometana:etil asetat 8:1:6 [12], sedangkan Wagner dan Bladt [11] menggunakan toluena:eter 1:1 yang dijenuhkan dengan asam asetat 10% sebagai fase gerak. Noda dilihat dengan lampu UV 365 nm. Untuk memperjelas warna noda dari metode Chakraborty, plat KLT disemprot dengan NH_3 [13], kemudian plat dilihat kembali di bawah lampu ultraviolet. Adanya senyawa kumarin ditandai dengan fluoresensi yang berwarna hijau-kuning .

Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis

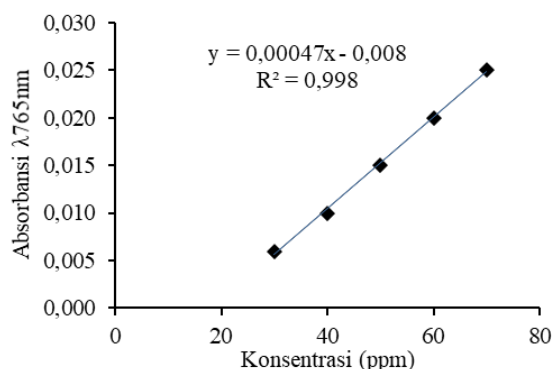
Terhadap fraksi n-heksana dilakukan kromatografi lapis tipis dan KLT preparatif dengan pelarut etil asetat p.a., diklorometana p.a., metanol p.a., dan n-heksana p.a., serta campuran pelarut dengan perbandingan tertentu dan fase diam berupa silika gel 60 GF254.

Selanjutnya dilakukan kromatografi kolom dengan pelarut n-heksana. Fase diamnya berupa silika gel 60 G. Masing-masing fraksi dianalisis dengan metode KLT. Fraksi-fraksi dengan pola pemisahan noda yang sama digabung diberi notasi A, B, C, D dan seterusnya.

3. Hasil dan Pembahasan

Kurva Kalibrasi Asam Galat

Kurva kalibrasi asam galat telah dibuat sebagai pembanding ekuivalen senyawa fenolat total yang berguna untuk menentukan senyawa fenolat total dalam fraksi n-heksana *Pimpinella alpina* Molck melalui persamaan regresi yang didapatkan seperti disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva kalibrasi asam galat dengan reagen Folin-Ciocalteu pada panjang gelombang 765 nm

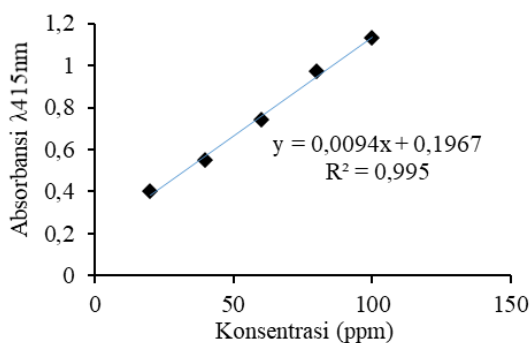
Hasil analisis terhadap larutan asam galat didapatkan kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $y = 0,00047x - 0,008$ dan harga koefisien korelasi (R^2) yaitu 0,998. Persamaan regresi menyatakan hubungan matematis antara konsentrasi asam galat dan absorbansinya pada pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan harga koefisien korelasi (R^2) menyatakan keeratan hubungan/ korelasi antara konsentrasi (sumbu x) dan absorbansi (sumbu y). Harga R^2 yang mendekati angka 1 menyatakan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier dan konsentrasi mempengaruhi absorbansi sebesar 99%.

Penentuan Kandungan Senyawa Fenolat Total

Hasil analisis kandungan senyawa fenolat total fraksi n-heksana *Pimpinella alpina* Molck adalah 45,04 mg ekuivalen asam galat/gram fraksi kering.

Kurva Kalibrasi Kuersetin

Kurva kalibrasi kuersetin telah dibuat untuk menentukan kadar senyawa flavonoid total dalam fraksi n-heksana *Pimpinella alpina* Molck melalui persamaan regresi yang didapatkan. Seperti disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva kalibrasi kuersetin dengan reagen AlCl₃ dan potasium asetat pada panjang gelombang 415 nm

Hasil analisis terhadap larutan kuersetin didapatkan kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $y = 0,009x + 0,196$ dan harga koefisien korelasi (R^2) yaitu 0,995.

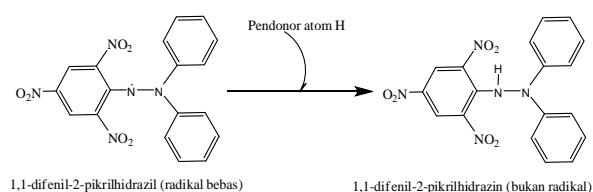
Penentuan Kandungan Senyawa Flavonoid Total

Hasil analisis kandungan senyawa flavonoid total pada fraksi n-heksana *Pimpinella alpina* Molck adalah 5,58 mg ekuivalen kuersetin/gram fraksi kering.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi n-heksana *Pimpinella alpina* Molck mengandung senyawa-senyawa fenolat dan flavonoid sehingga dapat digunakan untuk analisis fenolat total dan flavonoid total pada fraksi etanolnya. Fraksi etanol *Pimpinella anisum* mengandung fenolat total yaitu 77,5 mg ekuivalen asam galat/gram fraksi kering. Menurut Pramono [4] yang telah menentukan flavonoid total dari fraksi etil asetat *Pimpinella alpina* yaitu 0,78 mg ekuivalen epigenin/gram fraksi kering. Perbedaan fenolat total dan flavonoid total dalam fraksi n-heksana *Pimpinella alpina* Molck dengan fenolat total dan flavonoid total dalam fraksi etanol *Pimpinella anisum* dan fraksi etil asetat *Pimpinella alpina* ini disebabkan oleh perbedaan distribusi senyawa fenolat dan flavonoid yang cenderung akan banyak terlarut dalam pelarut polar seperti etanol dan etil asetat.

Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan uji DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) terhadap fraksi etanol dan n-heksana. Pengurangan intensitas warna ditandai dengan penurunan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm [14]. Reaksi peredaman radikal DPPH dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi peredaman radikal DPPH

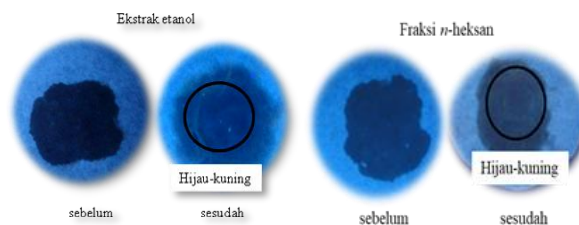
Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada fraksi n-heksana diperoleh IC₅₀ sebesar 13485 ppm. Hal ini disebabkan karena fraksi n-heksana *Pimpinella alpina*

Molck memiliki senyawa-senyawa fenolat/ flavonoid yang menurut Liu dkk. [15] memiliki peran penting dalam peredaman radikal DPPH.

Penelitian ini telah berhasil dilakukan analisis total fenolat, total flavonoid dan uji aktivitas antioksidan terhadap fraksi n-heksana yang diduga mengandung senyawa fenolat lain. Data ini penting dilakukan guna memberikan gambaran mengenai aplikasi-aplikasi fraksi etanol dan n-heksana dari *Pimpinella alpina* Molck sebagai bahan sediaan yang bermanfaat untuk antioksidan.

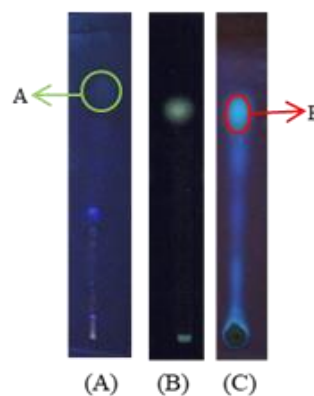
Identifikasi Senyawa Kumarin

Keberadaangolongan kumarin sebagai salah satu senyawa fenolat ditunjukkan dengan metode yang dilakukan oleh Farnsworth [10] dan metode KLT menurut Chakraborty dkk. [12]. Uji kumarin menunjukkan hasil yang positif pada ekstrak etanol dan fraksi n-heksana dengan terbentuknya warna fluoresensi hijau kuning di bawah lampu UV 365 nm pada kertas saring jenuh NaOH 10% yang telah diuapi sampel [10], seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Uji fitokimia kumarin pada ekstrak etanol dan fraksi n-heksana dengan metode Farnsworth [10]

Memurut metode Chakraborty dkk. [12] yang dilakukan dengan KLT dilakukan dengan pengembang n-heksana:diklorometana:etil asetat 8:1:6, noda dilihat dengan lampu UV 365 nm. Untuk memperjelas warna noda dari kumarin plat KLT disemprot dengan NH₃ sebagai pereaksi warna [13], kemudian plat KLT dilihat kembali di bawah lampu UV 365 nm. Adanya kumarin ditandai dengan fluoresensi yang berwarna hijau kekuningan [11], seperti disajikan pada Gambar 5.



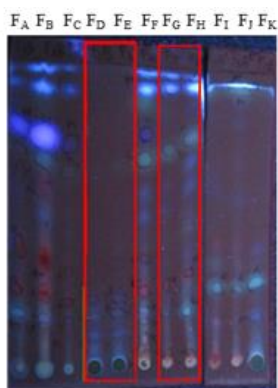
Gambar 5. Profil noda KLT fraksi n-heksana

Keterangan:

- (A) pengembang toluen:eter dijenuhkan dengan 10% asam asetat [11],

- (B) pembanding kumarin [11],
- (C) pengembang n-heksana: diklorometana:etil asetat 8:1:6 dan pereaksi warna NH₃ [12, 13]

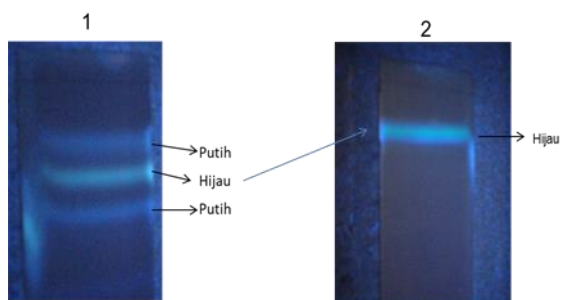
Kromatografi kolom bertujuan untuk mendapatkan komponen senyawa yang terdapat di fraksi n-heksana. Kemudian dilakukan analisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT), pada pola noda yang sama digabungkan sehingga diperoleh beberapa fraksi yang selanjutnya disebut sebagai fraksi A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, dan K. Hasil dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Profil noda fraksi A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, dan K dengan pengembang n-heksana: diklorometana 2:1 di bawah lampu UV 365 nm

Hasil dari pengelompokan fraksi diperoleh 11 fraksi, yang kemudian disebut dengan fraksi A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, dan K. Analisis selanjutnya dilakukan pada F_i (D dan E) karena jumlahnya lebih banyak dari yang lainnya.

Analisis dengan KLT preparatif selanjutnya dilakukan pada isolat F_i dengan pengembang n-heksana:diklorometana:etil asetat 8:1:6 yang mempunyai pola pemisahan terbaik setelah melalui analisis berbagai pelarut. Noda yang diduga golongan kumarin ditunjukkan dengan warna hijau kuning [11] di bawah lampu UV 365 nm, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7, kemudian dilakukan uji kemurnian dengan berbagai pelarut.



Gambar 7. Profil noda KLT preparatif dengan pengembang n-heksana:diklorometana:etil asetat 8:1:6 di bawah lampu UV 365 nm

Hasil uji kemurnian dengan berbagai pelarut menunjukkan adanya satu noda yang ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Hasil uji kemurnian isolat F₁ dengan berbagai pengembang dengan pereaksi warna NH₃, dilihat di bawah lampu UV 365 nm

Keterangan:

- (1) n-heksana,
- (2) aseton,
- (3) kloroform,
- (4) n-heksana:diklorometana:etil asetat 8:1:6,

Uji kemurnian menggunakan berbagai pengembang terhadap noda uji hasil KLT preparatif menunjukkan adanya noda tunggal yang berwarna hijau kuning, setelah plat KLT disemprot dengan pereaksi warna NH₃ dan dilihat di bawah lampu UV 365 nm, sehingga dapat noda hasil KLT preparatif F_i merupakan golongan senyawa kumarin. Senyawa kumarin yg diperoleh dari KLT preparatif tidak dilakukan analisis mengingat kuantitasnya sangat terbatas. Bagaimanapun juga struktur lengkap kumarin belum dapat dibuktikan secara lengkap.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil serangkaian analisis terhadap tanaman *Pinpinella alpina* Molck memiliki kandungan senyawa total fenolat fraksi n-heksana yaitu 45,04 mg ekuivalen asam galat/g fraksi kering dan kandungan senyawa total flavonoid terbesar fraksi n-heksana yaitu 5,58 mg ekuivalen kuersetin/gram fraksi kering. Sedangkan aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan (IC₅₀) 13485 ppm. Noda hasil KLT preparatif F_i merupakan golongan senyawa kumarin.

5. Daftar Pustaka

- [1] Abbas Ali Dehpour, Mohammad Ali Ebrahimzadeh, Nabavi Seyed Fazel, Nabavi Seyed Mohammad, Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition, *Grasas y aceites*, 60, 4, (2009) 405-412 <http://dx.doi.org/10.3989/gya.010109>
- [2] K Hüsnü Can Baser, Nurhayat Tabanca, Nese Kirimer, Erdal Bedir, Ikhlas A Khan, David E Wedge, Recent advances in the chemistry and biological activities of the *Pimpinella* species of Turkey, *Pure and applied chemistry*, 79, 4, (2007) 539-556 <http://dx.doi.org/10.1351/pac200779040539>

- [3] M Suzery, Nurhasnawati E Ngadiwiyono, B Cahyono, Senyawa stigmasterol dari *Pimpinella alpina* Molk, *Media Medika Indonesiana, Suppl*, 29, 1, (2004) 37-39
- [4] Suwijiyono Pramono, Efek Antiinflamasi Beberapa Tumbuhan Umbelliferae, *HAYATI Journal of Biosciences*, 12, 1, (2005) 7-10
[http://dx.doi.org/10.1016/S1978-3019\(16\)30316-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1978-3019(16)30316-3)
- [5] Trevor Robinson, Kandungan organik tumbuhan tinggi, *Bandung: ITB*, 14, 3, (1995) 1-6
- [6] G. K. Jayaprakasha, Tamil Selvi, K. K. Sakariah, Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts, *Food Research International*, 36, 2, (2003) 117-122
[http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00116-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00116-3)
- [7] Saeid Soltani, Sara Saadatm, Ramzanali Khavarinejad, Taher Nejadstari, Antioxidant and antibacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Ktz. in Caspian Sea Coast, Iran, *African Journal of Biotechnology*, 10, 39, (2011) 7684-7689
<http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.491>
- [8] Kamran Ghasemi, Yosef Ghasemi, Mohammad Ali Ebrahimzadeh, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues, *Pak J Pharm Sci*, 22, 3, (2009) 277-281
- [9] Saurabh K Banerjee, CG Bonde, Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia Retusa* Spreng Bark: Impact of dielectric constant and geographical location, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 5, (2011) 817-822
- [10] Norman R. Farnsworth, Biological and phytochemical screening of plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 3, (1966) 225-276
<http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600550302>
- [11] Hildebert Wagner, Sabine Bladt, Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas, 2th Edition ed., Springer Science & Business Media, Germany, 1996.
- [12] DD Chakraborty, V Ravi, P Chakraborty, Phytochemical evaluation and TLC protocol of various extracts of *Bombax ceiba* Linn, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1, 8, (2010) 66-73
- [13] TRABI Fézan, Purification and characterization of a coumarin in methanolic leaf extracts of *Secamone afzelii* (Asclepiadaceae) from Côte d'Ivoire, *Journal of Animal & Plant Sciences*, 3, 2, (2009) 182-185
- [14] S Banerjee, Judy Gopal, P Muraleedharan, AK Tyagi, Baldev Raj, Physics and chemistry of photocatalytic titanium dioxide: visualization of bactericidal activity using atomic force microscopy, *Current Science*, 90, 10, (2006) 1378-1383
- [15] Xiaoli Liu, Mouming Zhao, Jinshui Wang, Bao Yang, Yueming Jiang, Antioxidant activity of methanolic extract of *emblica* fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 3, (2008) 219-228
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2007.10.001>